

機関番号:15101

研究種目:基盤研究 (C)

研究期間:2008 ~ 2010

課題番号:20591570

研究課題名(和文) 進行食道癌における放射線化学療法効果増強システムの開発

研究課題名(英文) Development of effectiveness of chemoradiotherapy for advanced esophageal cancer

研究代表者 池口 正英 (IKEGUCHI MASAHIDE)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号:20193188

研究成果の概要 (和文):

NF κ B siRNAによる食道癌の化学療法効果増強作用を検討した。食道癌109例の免疫染色では、NF κ B発現は60%の症例の癌細胞核に認め、癌の進行と相関した。進行度II, III68例の検討では、NF κ B陽性例の予後は不良であった。培養癌細胞ではNF κ Bは細胞質に発現したが、刺激因子TNF α を添加後にNF κ Bは細胞質から核へ移行し、5-FU治療に抵抗した。これにNF κ B siRNAを作用させると癌細胞の増殖は抑制され、NF κ B siRNAの臨床応用への可能性を示唆した。

研究成果の概要 (英文):

Chemotherapy is the key of treatment of advanced esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). Immunohistochemistry of 109 patients with ESCC revealed that NF- κ B expressed in the nuclei of 60% of tumors and correlated with tumor progression. The effect of 5-FU was evaluated on the proliferation of two ESCC cell lines (TE-4 and TE-8). When cultured cells were exposed to TNF α , NF- κ B translocated to the nucleus and was activated. Cells with activated NF- κ B had poor sensitivity to 5-FU. After transfection with NF- κ B siRNA into the cells, the level of NF- κ B protein was decreased and the sensitivity against to 5-FU of cell was recovered. These results suggest that NF- κ B may be a target for ESCC therapy because of its selective expression in this type of cancer.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード:食道癌、放射線化学療法、NF κ B siRNA

1. 研究開始当初の背景

食道癌は治療に難渋し、予後も極めて悪い疾患である。たとえ根治手術が施行されても、多くが再発し、化学療法をせざるを得なくなる。また、気管、肺、大動脈へ浸潤した進行食道癌は、手術適応でなく、放射線化学療法（Chemo-radiotherapy; CRT）が第一選択となる。しかし、CRTの治療効果は、未だ満足するレベルではない。さらに、CRTは食道炎や肺臓炎などを誘発し、死に至る有害な副作用がある。進行、再発食道癌において、CRTの感度増強と副作用軽減は食道癌治療において正に急務であると考えられる。

2. 研究の目的

以前の研究で、NF-κB siRNAは癌細胞の核に移行し、活性化したNF-κBの発現を抑制し、癌細胞をアポトーシスへ導くとともに、癌細胞の制癌剤感受性を高めることを確認した。このNF-κB siRNAを食道癌局所に注入すると、癌細胞はNF-κBを産生できなくなり、アポトーシスに陥り、放射線や化学療法の感受性が高まると期待される。NF-κB siRNAとCRTの併用により、安全で腫瘍の縮小効果を最大限に引き出せるシステムの開発がこの研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 免疫染色：過去に切除された食道癌標本のブロックから切片を切り出し、食道癌組織におけるNF-κBタンパクの発現を免疫染色によって確認する。1982年から1997年まで、教室で手術が施行された食道扁平上皮癌109例の癌組織標本でNF-κBの一次抗体を用いた免疫組織染色を行った。

(2) 培養細胞を用いた研究：TE-4、TE-8の食道癌細胞を培養し、食道癌細胞におけるNF-κB蛋白の発現と制癌剤である5-FU投与時の癌細胞の増殖、アポトーシスを検討し、NF-κB siRNAの作用を検討した。

4. 研究成果

(1) 免疫染色の結果

①NF-κB蛋白発現は、109例中65例(59.6%)に認められた。

②NF-κB蛋白は食道癌細胞の細胞核に発現していた(図1)。

図1は免疫組織染色の結果を示す。右がNF-κB陽性例で、NF-κB蛋白が褐色に癌細胞の核に染色されているのがわかる。左はNF-κB染色陰性例である。

③食道癌症例109例の臨床病理学的特徴をNF-κB陰性、陽性例で比較した。

免疫組織化学染色

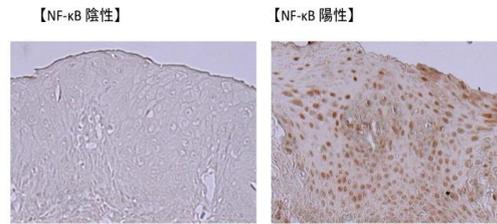


図1

表1に示すように、NF-κB発現と、癌の深達、リンパ節転移が関連した。

表1 NF-κB発現と臨床病理学的因子との関係

		NF-κB 陽性 (n=67)	NF-κB 陰性 (n=42)	p-value*
Gender	Male	57	40	0.0990
	Female	10	2	
p-Stage	0 I II	34	25	0.0371
	III IV	33	17	
pathology	poor	32	23	0.4768
	moderate	32	16	
	well	3	3	
p-T classification	T1, T2	29	20	0.8414
	T3, T4	38	22	
p-N classification	N0	30	19	0.9624
	N1	37	23	
p-M classification	M0	63	40	0.7878
	M1	4	2	
Tumor size	< 5cm	38	22	0.6579
	≥ 5cm	29	20	

*The p-value was calculated by chi-square test.

即ち、NF-κB陽性例は陰性例に比べ、より進行した癌が多いことが示された。

④進行度II, III症例69例の予後はNF-κB陽性、陰性で比較した。5年生存率は、NF-κB陽性例(41例)で18%、陰性例(28例)で32%。有意の差ではないがNF-κB陽性例の予後は不良で(P=0.058)あった。

生存曲線 (Kaplan-Meier curve)

(Stage II, Stage III patients : 69 症例)

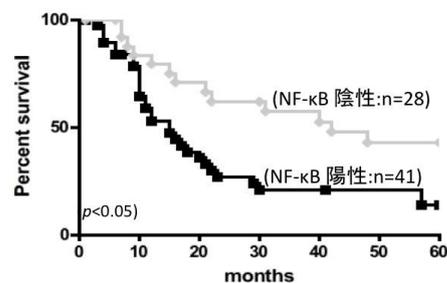


図2

結語：進行食道癌においては、NF κ B 発現は癌細胞核にのみ認められた。食道癌におけるNF κ B 発現が食道癌の悪性度を推し量る指標となりうる可能性が示唆された。

(2) 培養細胞を用いた研究

①TE-4、TE-8 の食道癌細胞を培養し、食道癌細胞における NF κ B 蛋白の発現を検討した。図3に示すように、培養状態においては、

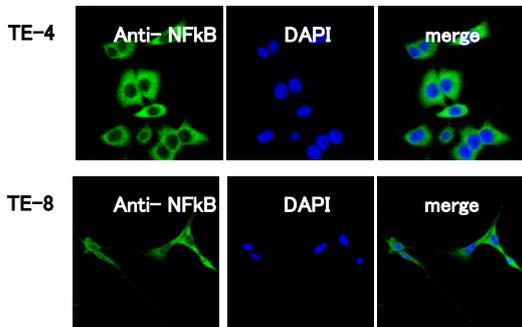


図3 (×60)

NF κ B 蛋白は細胞質にのみ発現し、細胞核での発現は認められていない。

②この状態でNF κ B siRNAを作用させても細胞質のNF κ B 蛋白発現は抑制されたが、細胞核内のNF κ B 蛋白は発現抑制は軽度であった。

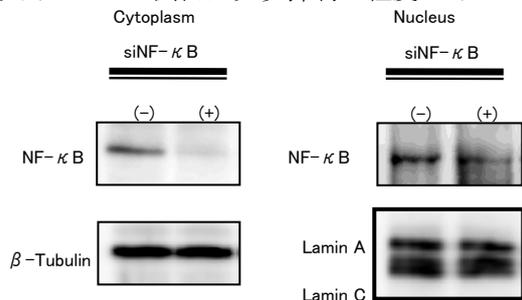


図4

③TNF- α を培養液に添加すると、培養癌細胞の細胞質に発現していたNF κ Bが癌細胞核へ移行することが確認された(図5)。

④TNF- α を作用させ、NF κ Bが癌細胞核へ移行した癌細胞は、5-FUの治療に抵抗性を示し、癌細胞の増殖抑制は限定された状態であったが、この状態にNF κ B siRNAを作用させると、癌細胞は再びアポトーシスに陥り(データは示していない)、増殖は抑制された(図6)。

図5

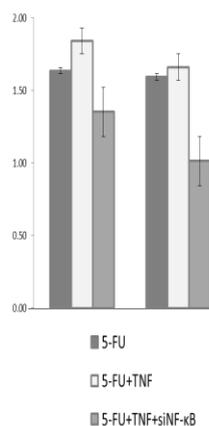
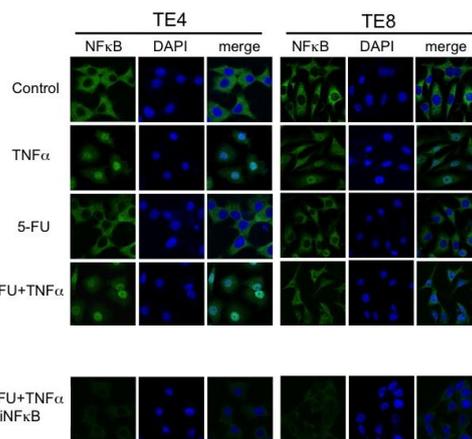


図6

まとめ：

以上の結果より、実際の実臨床においては、食道癌細胞は様々な外的刺激を受ける状態にあり、その様な常態下では、NF κ Bは癌細胞核に移行しており、通常の制癌剤や放射線治療に抵抗性を示すと考えられる。その状態でも、NF κ B siRNAはNF κ B 蛋白の発現を抑制することができ、5-FUとの共同作業で癌細胞をアポトーシスへと導き、癌細胞の増殖を抑制できた。即ち、治療抵抗性の進行食道癌患者に対し、副作用が軽微であると考えられるNF κ B siRNAの局所投与などで癌細胞の制癌剤に対する感受性を増加させることが可能と考えられ、臨床応用への道筋を示すことができたと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Ikeguchi M, Yamamoto M, Arai Y, Maeta Y, Ashida K, Katano K, Miki Y and Kimura T. Fucoidan reduces the toxicities of chemotherapy for patients with unresectable advanced or recurrent colorectal cancer. ONCOLOGY LETTERS、査読あり、DOI: 10.3892/ol.2011.254, 2: 319-322, 2011.
- ② Ikeguchi M, Kuroda H, Kihara K, Hatada T, Matsunaga T, Fukuda K, Saito H, Tatebe S. Nutritional Assessment of Patients After Pylorus-Preserving Gastrectomy for Early Gastric Cancer. Indian J Surg、査読あり、72 :453-457, 2010.
- ③ Ikeguchi M, Hatada T, Yamamoto M, Miyake T, Matsunaga T, Fukuda K, Saito H, Tatebe S. Evaluation of a pylorus-preserving gastrectomy for patients preoperatively diagnosed with early gastric cancer located in the middle third of the stomach. Surg Today、査読あり、40: 228-233, 2010.
- ④ Miyake T, Endo K, Honjo S, Hirooka Y, Ikeguchi M. Expression of DNA methyltransferase (DNMT) 1, 3a and 3b proteins in human hepatocellular carcinoma. Yonago Acta medica、査読あり、53: 1-7, 2010.
- ⑤ Yamamoto M, Saito H, Kihara K, Katano K, Ikeguchi M. NKG2D+CD4+ T cells with immune suppressive property increase in patients with colorectal cancer. Yonago Acta medica、査読あり、53: 9-16, 2010.
- ⑥ Saito H, Kuroda H, Matsunaga T, Fukuda K, Tatebe S, Tsujitani S, Ikeguchi M. Prognostic indicators in node-negative advanced gastric cancer patients. J Surg Oncol、査読あり、101: 622-625, 2010.
- ⑦ Ikeguchi M, Miyake T, Matsunaga T, Yamamoto M, Fukumoto Y, Yamada Y, Fukuda K, Saito H, Tatebe S, Tsujitani S. Recent results of therapy for scirrhous gastric cancer. Surg Today、査読あり、2009; 39: 290-294, 2009.
- ⑧ Ikeguchi M, Hatada T, Yamamoto M, Miyake

T, Matsunaga T, Fukumoto Y, Yamada Y, Fukuda K, Saito H, Tatebe S. Serum interleukin-6 and -10 levels in patients with gastric cancer. Gastric Cancer、査読あり、12: 95-100, 2009.

- ⑨ Ikeguchi M, Miyake T, Matsunaga T, Yamamoto M, Fukumoto Y, Yamada Y, Fukuda K, Saito H, Tatebe S, Tsujitani S. Free jejunal graft reconstruction after resection of neck cancers: our surgical technique. Surg Today、査読あり、39: 925-928, 2009.
- ⑩ Osaki T, Saito H, Fukumoto Y, Yamada Y, Fukuda K, Tatebe S, Tsujitani S, Ikeguchi M. Inverse correlation between NKG2D expression on CD8+ T cells and the frequency of CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with esophageal cancer. Disease of the Esophagus、査読あり、22: 49-54, 2009.
- ⑪ Fukumoto Y, Yamada Y, Fukuda K, Saito H, Tatebe S, Tsujitani S, Ikeguchi M: Clinical findings on fibroblast activation protein in patients with gastric cancer. Yonago Acta medica、査読あり、52:21-25, 2009.
- ⑫ 齊藤博昭、井上雅史、松永知之、福本陽二、山田敬教、福田健治、建部 茂、辻谷俊一、池口正英: 特集 スキルス胃癌への新しいアプローチ スキルス胃癌の臨床病理学的特徴と新たな治療法の開発。癌の臨床、査読なし、55: 41-46, 2009.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 畑田智子、建部 茂、池口正英: 食道癌におけるNF κ B発現とsiRNAによるNF κ B阻害の効果。第69回日本癌学会総会、2010年10月22-24日、大阪。
- ② 畑田智子、建部 茂、池口正英: 食道癌におけるNF κ B発現とNF κ Bの抑制による治療効果の検討。第48回日本癌治療学会学術集会、2010年10月28-30日、京都。
- ③ 建部 茂、ほか15名、15番目: 胃癌術後補助化学療法におけるTS-1隔日投与法の無作為化比較第II相試験。第48回日本癌治療学会学術集会、2010年10月28-30日、京都。

- ④ 近藤 亮、高屋誠吾、畑田智子、谷口健次郎、奈賀卓司、池口正英：当院における切除不能胆道癌に対する化学療法への検討。第 48 回日本癌治療学会学術集会、2010 年 10 月 28-30 日、京都。

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.tottori-u.ac.jp/surgonco/867/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池口 正英 (IKEGUCHI MASAHIDE)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：20193188